Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale" n. 346 del 13 dicembre 1978

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I

GAZZETTA UFFICIALE

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA ROMA - Mercoledì, 13 dicembre 1978 SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI MENO I FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DI GRAZIA E GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE DELLE LEGGI E DECRETI - CENTRALINO 6510I
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA GIUSEPPE VERDI, 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 8508

ORDINANZA MINISTERIALE 11 ottobre 1978.

Limiti di cariche microbiche tollerabili in determinate sostanze alimentari e bevande.

LEGGI E DECRETI

ORDINANZA MINISTERIALE 11 ottobre 1978.

Limiti di cariche microbiche tollerabili in determinate sostanze alimentari e bevande.

IL MINISTRO DELLA SANITA'

Visto l'art. 5, lettera *c*), della legge 30 aprile 1962, n. 283, che prevede la fissazione di limiti massimi di cariche microbiche nelle sostanze alimentari e nelle bevande;

Ravvisata l'opportunità, in considerazione della complessità della materia, di provvedere in primo luogo alla disciplina di cui trattasi nella fase della produzione, nella quale più efficaci risultano i controlli a tutela della salute pubblica;

Considerata la necessità di fissare i limiti massimi di cariche microbiche, come prima attuazione, per determinate sostanze alimentari e bevande tra quelle di maggior significato nutrizionale e di particolare rilevanza sotto il profilo epidemiologico;

Considerato che, contestualmente alla determinazione dei limiti di cariche microbiche, occorre provvedere alla statuizione dei criteri di campionamento, delle modalità di prelievo, conservazione e trasporto dei campioni, nonché delle metodiche di analisi delle varie sostanze alimentari;

Sentita la commissione permanente per i metodi ufficiali di analisi di cui all'art. 21 della legge 30 aprile 1962, n. 283;

Sentito il Consiglio superiore di sanità;

Ordina:

Art. 1.

I limiti di cariche microbiche, per le sostanze alimentari considerate nella presente ordinanza, sono quelli fissati nell'allegata tabella *A*.

Per « cariche microbiche » delle sostanze alimentari si intendono, ai fini della presente ordinanza, i valori numerici dei microrganismi indicati nell'allegata tabella *A* e determinati con i metodi descritti nella tabella *C* allegata alla presente ordinanza.

Le disposizioni di cui alla presente ordinanza si applicano anche ai prodotti alimentari elencati nella tabella *A*, provenienti dall'estero, i quali debbono possedere requisiti microbiologici prescritti dalla tabella all'atto del prelevamento dei campioni di cui al successivo art. 3.

Art. 2.

Qualora l'analista, nel caso di riscontrata difformità della carica microbica dai limiti stabiliti nell'allegata tabella *A*, rilevi la sussistenza di condizioni microbiologiche che rendano configurabile l'ipotesi di reato di cui all'art. 5, lettera *d*), della legge 30 aprile 1962, n. 283, per alterazione o nocività dell'alimento, deve farne specifica menzione nel referto.

Art. 3.

Il prelevamento dei campioni delle sostanze alimentari indicate nella tabella *A* per il controllo microbiologico deve essere effettuato sul prodotto finito pronto per la vendita presso gli stabilimenti e laboratori di produzione, preparazione e confezionamento. Detto prelevamento deve essere eseguito per ogni lotto o frazione di esso nei quantitativi e secondo le modalità previsti nella tabella *B*.

Per lotto, ai fini della presente ordinanza, deve intendersi la quantità di sostanza alimentare, prodotta, trattata e confezionata in condizioni uniformi in un ciclo di produzione omogenea, comunque identificabile.

Il prelevamento di sostanze alimentari racchiuse in contenitori di cui si debba procedere all'apertura all'atto del prelevamento, deve essere eseguito con adeguata attrezzatura e con le regole dell'asepsi.

Per le sostanze alimentari indicate nella tabella *A* provenienti dall'estero, il prelevamento dei campioni destinati al controllo microbiologico deve essere effettuato nei posti di confine, nei porti, negli aeroporti e nelle dogane interne.

Art. 4.

Il campione prelevato deve essere ripartito, salvo quanto previsto dal quinto comma e dall'ultimo comma del presente articolo, in quattro aliquote, ognuna delle quali deve essere confezionata in contenitore chiuso e sigillato con piombini o suggelli recanti impressa la dicitura dell'ufficio prelevatore.

Il responsabile dell'esercizio od un suo rappresentante ovvero il custode della merce ha facoltà di apporre sui campioni anche un proprio timbro o suggello; di tale eventualità si deve far menzione nel verbale di prelevamento.

Su ogni contenitore si applica e si assicura, con piombino o altro suggello, un cartellino recante l'intestazione dell'ufficio che ha disposto il prelievo; su tale cartellino si indica la data e l'ora del prelevamento, la natura della merce prelevata, la temperatura a cui il campione deve essere conservato, il numero del verbale di prelevamento.

Ciascun cartellino deve essere firmato da chi esegue il prelevamento e dal responsabile dell'esercizio o da un suo rappresentante o dal custode della merce. Ove questi ultimi si rifiutassero di firmare, se ne farà menzione nel verbale di prelevamento.

Nel caso di latte a breve conservazione (pastorizzato), il campione prelevato deve essere ripartito in due aliquote ed i prelevatori devono invitare l'interessato a comunicare loro o alla sezione medicomicrografica del laboratorio provinciale di igiene e profilassi, competente per territorio, o all'Istituto sperimentale zooprofilattico o ad altri laboratori all'uopo autorizzati a norma dell'art. 1, ottavo comma, della legge 30 aprile 1962, n. 283, entro 24 ore, il nome e il recapito di un difensore di fiducia.

Una delle due aliquote del campione viene consegnata al detentore del prodotto insieme alla copia del verbale di prelevamento, mentre l'altra viene destinata

al laboratorio provinciale di igiene e profilassi o agli altri laboratori all'uopo autorizzati per l'analisi di competenza, con l'osservanza delle prescrizioni di cui al successivo art. 5.

Se entro il termine previsto nel quinto comma del presente articolo, l'interessato non ha provveduto alla nomina di un difensore, il direttore della sezione medico-micrografica del laboratorio provinciale di igiene e profilassi o degli altri laboratori autorizzati chiede immediatamente al pretore, anche a mezzo di incaricato, la nomina di un difensore di ufficio.

Il laboratorio provvede ad avvertire, con 24 ore di preavviso, il difensore nominato perché possa presenziare, eventualmente assistito da un consulente di parte, alla esecuzione dell'analisi.

Ove l'interessato presenti istanza di revisione ai sensi dell'art. 1 della legge 30 aprile 1962, n. 283, deducendo i motivi di contestazione dell'analisi di primo grado, tale revisione viene effettuata dall'Istituto superiore di sanità attraverso l'esame del solo referto di analisi, compilato a cura del laboratorio provinciale di igiene e profilassi o degli altri laboratori autorizzati secondo la scheda-tipo che sarà all'uopo predisposta dal Ministero della sanità sentito l'Istituto superiore di sanità.

Per il controllo microbiologico dei prodotti alimentari provenienti dall'estero, da effettuarsi nei posti di confine, nei porti, negli aeroporti e nelle dogane interne, il campione prelevato deve essere costituito da due aliquote, di cui una viene messa a disposizione della ditta importatrice.

Art. 5.

I campioni dei gelati e delle sostanze alimentari congelate di cui alla tabella *A* debbono essere conservati, dal momento del prelievo al momento in cui viene iniziata l'analisi, ad una temperatura non superiore a —10°C; quelli di latte a breve conservazione (pastorizzato) ad una temperatura non superiore ai +4°C.

Il trasporto dei campioni, da conservare alle temperature suindicate, deve essere effettuato, sin dal momento del prelievo, in contenitori coibentati.

Art. 6.

Il verbale di prelevamento, redatto in quadruplice copia, deve contenere:

a) il numero d'ordine del prelievo;

b) la data, l'ora e il luogo del prelievo;

c) le generalità e la qualifica del personale che esegue il prelievo;

d) il nome o la ragione sociale e la sede dello stabilimento o del laboratorio di produzione, preparazione e confezionamento in cui è stato eseguito il prelevamento nonché le generalità del responsabile dello stabilimento o del laboratorio o di chi lo rappresenta, ovvero del custode della merce che ha assistito al prelevamento;

e) l'indicazione della natura delle sostanze prelevate, la descrizione delle condizioni ambientali di conservazione e, nel caso di prodotti racchiusi in contenitori, le indicazioni riportate sulla confezione. Deve inoltre essere precisato se le sostanze siano state prelevate previa apertura del contenitore;

f) le modalità seguite nel prelevamento dei campioni;

g) la dichiarazione del personale che procede al prelievo, dalla quale risulti l'eventuale sequestro preventivo delle sostanze da cui è stato prelevato il campione;

h) l'indicazione della temperatura alla quale i campioni debbono essere mantenuti, secondo quanto previsto dall'art. 5 della presente ordinanza;

i) la dichiarazione che il verbale è stato letto alla presenza degli interessati (proprietario o detentore della merce ovvero loro rappresentante) e che a questi ne viene consegnata una copia insieme ad un'aliquota del campione;

l) la firma del prelevatore o quella del responsabile dello stabilimento o del laboratorio o di chi lo rappresenta, ovvero del custode della merce che ha assistito al prelevamento; qualora gli interessati si rifiutassero di firmare dovrà esserne fatta menzione nel verbale.

Una copia del verbale ed un'aliquota dei campioni medesimi vengono rilasciate al detentore della merce; altre due aliquote, accompagnate ciascuna da una copia del verbale di prelevamento, vengono inviate al laboratorio provinciale d'igiene e profilassi, sezione medico-micrografica o ad altri laboratori autorizzati per essere destinate, rispettivamente, una all'analisi di prima istanza e l'altra all'analisi di revisione; la quarta aliquota viene anch'essa inviata allo stesso laboratorio, per esservi conservata a disposizione dell'autorità giudiziaria quale strumento di riserva per una eventuale perizia giudiziale; la quarta copia del verbale di prelevamento viene inviata all'autorità sanitaria che ha disposto il campionamento.

Il laboratorio provinciale d'igiene e profilassi, sezione medico-micrografica, o gli altri laboratori autorizzati devono curare la razionale conservazione dei campioni per una eventuale analisi di revisione da parte dello Istituto superiore di sanità.

Tali campioni devono essere conservati per la durata massima di giorni trenta, a decorrere dalla data di ricevimento, da parte degli interessati, dell'esito della analisi di prima istanza.

Sono fatte salve le disposizioni di cui al precedente art. 4 per quanto concerne il latte a breve conservazione (pastorizzato).

Art. 7.

La presente ordinanza sarà pubblicata nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 11 ottobre 1978

Il Ministro: ANSELMI

TABELLA *A*

Prodotto alimentare	Determinazioni analitiche	*n* (*)	Limiti di tolleranza
I. — *LATTE*			
A) latte a lunga conservazione (sterilizzato)	Numero totale delle colonie (flora aerobica a +32°C; termofila a +55°C)	5 u.c. (1)	12 colonie/ml in tutte le u.c.
B) latte a media conservazione (UHT)	Numero totale delle colonie (flora aerobica a +32°C; termofila a +55°C)	5 u.c. (1)	110 colonie/ml in tutte le u.c.
C) Latte a breve conservazione (pastorizzato)	Coliformi	5 u.c. (2)	<0,3/ml in 4 u.c. Non oltre 12/ml in una sola delle 5 u.c.
D) Latte in polvere per la alimentazione della prima infanzia	Numero totale delle colonie (flora aerobica a +32°C) (3)	5. u.c.	10.000 colonie/g in tutte le u.c.
	Coliformi	5 u.c.	Assenza in 1 g in tutte le u.c.
	Staphylococcus aureus	5 u.c.	Assenza in 1 g in tutte le u.c.
	Salmonella	10 u.c.	Assenza in 25 g in tutte le u.c.
II. — *PRODOTTI D'UOVO*			
A) Uova sgusciate, pastorizzate, congelate; tuorlo pastorizzato congelato	Numero totale delle colonie (flora aerobica a +32°C)	5 u.c.	Non oltre 100.000 colonie/g in 3 u.c. Non oltre 1.000.000 colonie/g in 2 u.c.
	Salmonella	10 u.c.	Assenza in 25 g in tutte le u.c.
B) Albume pastorizzato congelato	Numero totale delle colonie (flora aerobica a +32°C)	5 u.c.	Come alla lettera *A*)
	Salmonella	10 u.c.	Come alla lettera *A*)
C) Uova pastorizzate in polvere	Numero totale delle colonie (flora aerobica a +32°C)	5 u.c.	Non oltre 100.000 colonie/g in 3 u.c. Non oltre 1.000.000 colonie/g in 2 u.c.
	Coliformi	5 u.c.	Non oltre 120/g in 4 u.c. Non oltre 1100/g in 1 u.c.
	Salmonella	10 u.c.	Come alla lettera *A*)
D) Albume pastorizzato cristallizzato	Numero totale delle colonie (flora aerobica a +32°C)	5 u.c.	Come alla lettera *C*)
	Coliformi	5 u.c.	Come alla lettera *C*)
	Salmonella	10 u.c.	Come alla lettera *A*)
III. — *GELATI*			
A) Gelati a base di latte, di crema di latte e di altri derivati del latte, con o senza uova o prodotti di uovo	Numero totale delle colonie (flora aerobica a +32°C su terreno al gelisato)	5 u.c.	Non oltre 100.000 colonie/g in 4 u.c. Non oltre 1.000.000 colonie/g in 1 u.c.
	Coliformi	5 u.c.	Non oltre 120/g in 4 u.c. Non oltre 1100/g in 1 u.c.
B) Gelati comunque contenenti tali ingredienti, escluse le torte variegate	*Staphylococcus aureus*	5 u.c.	Non oltre 12/g in 4 u.c. Non oltre 110/g in 1 u.c.
	Salmonella	10 u.c.	Assenza in 25 g in tutte le u.c.
IV. — *PREPARATI PER GELATI*			
A) Preparati per gelati a base di latte, di crema di latte e di altri derivati del latte, con o senza uova o prodotti d'uovo e preparati comunque contenenti tali ingredienti	Numero totale delle colonie (flora aerobica a +32°C sul terreno al gelisato)	5 u.c.	Non oltre 1000 colonie/g in 3 u.c. Non oltre 10.000 colonie/g in 2 u.c.
	Coliformi	5 u.c.	Non oltre 12/g in 4 u.c. Non oltre 110/g in 1 u.c.
	Staphylococcus aureus	5 u.c.	<0,3/g in 4 u.c. Non oltre 12/g in 1 u.c.
	Salmonella	10 u.c.	Assenza in 25 g in tutte le u.c.

(*) *n* = Dimensioni del campione (numero delle unità campionarie = u.c.).
(1) Per ogni temperatura di incubazione.
(2) In tutte le unità campionarie la fosfatasi deve dare esito negativo. La validità di tale latte, da conservarsi comunque ad una temperatura non superiore a +4°C, non deve protrarsi oltre i quattro giorni dalla data di confezionamento.
(3) Esclusi i microrganismi di fermentazione delle polveri ottenute da latte acidificato per via biologica.

TABELLA *B*

CAMPIONAMENTO DELLE SOSTANZE ALIMENTARI

Ai fini del campionamento delle sostanze alimentari previsto dall'art. 3 della presente ordinanza:

— per *unità campionaria* o unità di campionamento (u.c.) deve intendersi una porzione singola o una confezione di sostanza alimentare scelta a caso su cui si eseguiranno le pertinenti prove analitiche;

— per *campione casuale* deve intendersi l'insieme di unità campionarie (u.c.) selezionate da un lotto predefinito, in modo tale che ciascuna unità abbia la stessa probabilità di essere estratta (1).

Qualora il lotto sia confezionato in contenitori che racchiudono due o più unità campionarie, la procedura di campionamento deve prevedere l'estrazione casuale del contenitore e, all'interno di questo, l'estrazione casuale dell'unità campionaria.

Al lotto predetto si riferiranno i risultati dell'indagine.

Ai fini della presente ordinanza, premesso che occorre costituire — salvo quanto previsto dall'art. 4, quinto comma, per il latte a breve conservazione (pastorizzato) — n. 4 aliquote del campione prelevato da destinare:

A) al laboratorio di analisi di prima istanza;

B) all'Istituto superiore di sanità per le analisi di revisione;

C) all'autorità giudiziaria per l'eventuale perizia;

D) al produttore:

necessita operare come segue:

I. — LATTE.

a) *Latte a lunga conservazione* (sterilizzato): prelevare un campione casuale di 40 confezioni da ripartire, con il criterio della casualità, in 4 aliquote;

b) *Latte a media conservazione* (UHT): procedere come per il latte a lunga conservazione;

c) *Latte a breve conservazione* (pastorizzato): prelevare un campione casuale di 10 confezioni da ripartire, con il criterio della casualità, in 2 aliquote;

d) *Latte in polvere per l'alimentazione della prima infanzia:* prelevare un campione casuale di 40 confezioni da ripartire, con il criterio della casualità, in 4 aliquote.

II. — PRODOTTI D'UOVO.

Uova sgusciate pastorizzate e congelate e tuorlo pastorizzato congelato - Albume pastorizzato congelato - Uova pastorizzate in polvere - Albume pastorizzato cristallizzato.

a) *Grandi confezioni:*

1) selezionare da un lotto un campione casuale costituito da 10 contenitori che vengono successivamente contrassegnati ciascuno con un numero d'ordine progressivo da 1 a 10 (cfr. punto I della tabella illustrativa di campionamento);

2) eseguire con cautele di asepsi, da ciascuno dei 10 contenitori, *una serie di 4 prelievi (u.c.) di non meno di g 200 ciascuno* (complessivamente 10 serie), collocando ognuno di tali prelievi in un distinto recipiente sterile; contrassegnare i 4 recipienti dei prelievi provenienti da un medesimo contenitore con una stessa lettera (cfr. punto II della tabella illustrativa di campionamento);

3) formare le 4 aliquote di campioni (*A-B-C-D* destinate rispettivamente: al laboratorio di analisi di prima istanza, all'Istituto superiore di sanità, all'autorità giudiziaria ed al produttore), in modo che ciascuna aliquota risulti costituita da n. 10 prelievi (cfr. punto III della tabella illustrativa di campionamento), ognuno dei quali deve essere scelto a caso da ciascuna delle 10 serie di cui al precedente punto II.

b) *Piccole confezioni:* prelevare un campione casuale di 40 confezioni da ripartire, con il criterio della casualità, in 4 aliquote.

c) *Piccole confezioni di peso inferiore a g 50*: prelevare un campione casuale costituito da un numero di confezioni tale da raggiungere una quantità di prodotto non inferiore a g 2000; ripartire il campione, con il criterio della casualità, in 4 aliquote.

(1) L'esigenza è di evitare vizi di campionamento, così che il campione possa rappresentare il lotto nel migliore dei modi.

III. — GELATI.

Gelati a base di latte, di crema di latte e di altri derivati del latte, con o senza uova o prodotti d'uovo, e gelati comunque contenenti tali ingredienti, escluse le torte variegate:

a) *Grandi confezioni o confezioni multidosi:* procedere come per le grandi confezioni di uova di cui al precedente punto II-*a*).

b) *Piccole confezioni o confezioni monodose:* prelevare un campione casuale di 40 confezioni da ripartire, con il criterio della casualità, in 4 aliquote.

c) *Piccole confezioni di peso inferiore a g 50*: prelevare un campione casuale costituito da un numero di confezioni tale da raggiungere una quantità di prodotto non inferiore a g 2000; ripartire il campione, con il criterio della casualità, in 4 aliquote.

IV. — PREPARATI PER GELATI.

Preparati per gelati a base di latte, di crema di latte e di altri derivati del latte, con o senza uova o prodotti d'uovo e preparati comunque contenenti tali ingredienti:

a) *Grandi confezioni o confezioni multidosi:* procedere come per le grandi confezioni di gelati di cui al precedente punto III-*a*).

b) *Piccole confezioni:* procedere come per le piccole confezioni di gelati di cui al precedente punto III-*b*).

TABELLA *C*

PARTICOLARI ISTRUZIONI PER IL PRELIEVO, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI. METODI DI OMOGENIZZAZIONE - TERRENI.

a) MODALITÀ DI PRELIEVO DEI CAMPIONI DELLE SOSTANZE ALIMENTARI DI CUI ALLA TABELLA B, PUNTO II, LETTERA A) (grandi confezioni di prodotti d'uovo), PUNTO III, LETTERA A) E PUNTO IV, LETTERA A) (grandi confezioni o confezioni multidosi di gelati e di preparati per gelati).

1) *Contenitori metallici a chiusura ermetica.*

Trasferire i contenitori in una zona pulita al riparo dalla polvere e dalle correnti d'aria (1).

Pulire accuratamente il fondello o il coperchio con un batuffolo di cotone imbevuto di alcool. Flambare fino a completa combustione dell'alcool; aprire a mezzo di adeguato strumento sterile il fondello o coperchio avendo cura di praticare una apertura di dimensioni sufficienti per rendere agevoli le manovre di prelevamento; operare in condizioni di asepsi.

2) *Involucri di cartone o plastica a perdere.*

Pulire accuratamente la zona di apertura con un batuffolo di cotone imbevuto di alcool-iodato, indi, a mezzo di forbici sterili, praticare una apertura idonea per la introduzione di una pipetta o di un cucchiaio sterile.

Procedere al prelievo con adeguata attrezzatura sterile, come indicato ai punti II e III della tabella illustrativa di campionamento dalle grandi confezioni dei prodotti d'uovo, dei gelati e dei preparati per gelati, secondo buona tecnica e norme di asepsi.

b) TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI DEI PRODOTTI INDICATI ALL'ART. 5 DELL'ORDINANZA.

1) *Campioni di prodotti d'uovo* (uova sgusciate, pastorizzate, congelate; tuorlo pastorizzato congelato, albume pastorizzato congelato) *e di gelati.*

Devono essere mantenuti ad una temperatura non superiore a —10°C per tutto il periodo intercorrente tra il prelevamento e l'espletamento delle analisi.

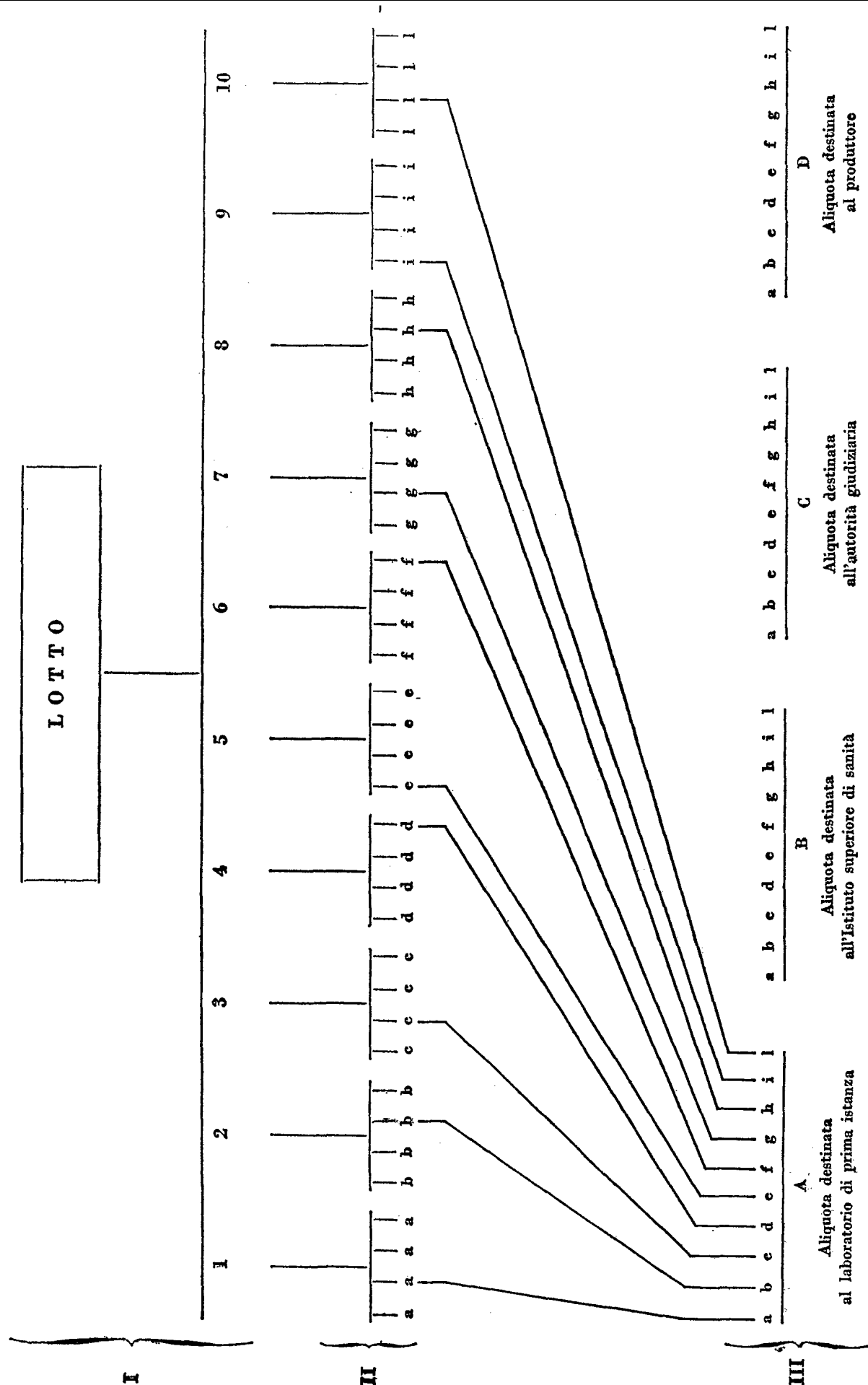
All'uopo devono essere utilizzati mezzi adeguatamente coibentati e forniti di idoneo sistema frigorigeno in grado di assicurare nel tempo la temperatura richiesta.

2) *Campioni di latte a breve conservazione* (pastorizzato).

Devono essere mantenuti ad una temperatura non superiore a +4°C per tutto il periodo intercorrente tra il prelevamento e l'espletamento delle analisi.

All'uopo può essere utilizzato il sistema di conservazione di cui al precedente punto 1), avendo cura di non usare temperature che possano variare lo stato fisico (liquido) del prodotto.

(1) Lavarli accuratamente con acqua, sapone e spazzola, asciugarli.

TABELLA ILLUSTRATIVA DI CAMPIONAMENTO DELLE UOVA (grandi confezioni), DEI GELATI (grandi confezioni o confezioni multidosi), DEI PREPARATI PER GELATI

c) TERRENI.

L'analista può utilizzare, per la determinazione delle cariche microbiche, sia i terreni preparati in laboratorio secondo le formule indicate nel presente allegato, sia quelli equivalenti reperibili in commercio in forma disidratata contrassegnati con asterisco. *L'analista deve precisare, nel certificato di analisi, il tipo di terreno utilizzato.*

d) METODI DI OMOGENEIZZAZIONE.

Metodo n. 1.

Strumentario e mezzi occorrenti:

1) Omogeneizzatore meccanico, modello a due velocità (o a singola velocità con controllo reostatico).

2) Coppe di metallo o di vetro di un litro di capacità, con coperchio, resistenti alle temperature di autoclave. Per ogni unità campionaria di alimenti da sottoporre ad esame è necessaria una coppa sterile (autoclavata a 121°C per 15').

3) Bilancia tecnica. Portata di almeno 2500 g sensibilità di 0,1 g.

4) Strumenti per preparare il materiale: forbici, pinze, coltelli, forchette, cucchiai, spatole, ecc., sterilizzati prima dell'uso in autoclave o preferibilmente in stufa a secco.

5) Corredo di pipette a bocca larga da 10 e da 1,0 ml, sterili.

6) Diluente: acqua triptonata 1%. Preparazione: sciogliere 1 g di triptone in 1 litro di acqua distillata ed aggiustare il pH a 7,0 ± 0,1; riempire le bottiglie da diluizione con volumi prestabiliti affinchè, dopo la sterilizzazione in autoclave (121°C per 15') il volume finale non differisca di ± 2% rispetto alla misura desiderata. Se i contenitori sono calibrati, dopo l'autoclavatura riportare a volume esatto con altra acqua triptonata sterile.

Procedimento:

1) Se il materiale in esame è congelato, farlo sgelare nel suo contenitore originale, tenendolo per 18 ore circa in un frigorifero a +2/+5°C. Se si presume possa essere facilmente disgregato (ad esempio i gelati tipo ice-cream) *procedere senza premettere lo scongelamento.*

2) Fare la tara della coppa vuota e quindi pesare direttamente in essa la quantità di materiale necessario per l'analisi.

3) Aggiungere alla coppa un quantitativo di acqua triptonata corrispondente a 9 volte il peso del materiale di cui al n. 2). Con tale aggiunta si realizza la diluizione a 10^{-1} del materiale da esaminare.

4) Omogeneizzare rapidamente. Partire a bassa velocità, quindi passare alla velocità maggiore dopo pochi secondi. Il tempo necessario per una buona omogeneizzazione non deve superare i 2 minuti ad alta velocità. Per materiali facilmente disgregabili e tendenti a dare schiuma anche un solo minuto può bastare. Attendere 2 o 3 minuti perchè si dissolva la schiuma.

5) Prima di procedere alla diluizione lasciare l'omogeneizzato 10^{-1} per 15' a temperatura ambiente per promuovere la rivivificazione dei microrganismi.

6) Trasferire 10 ml dell'omogeneizzato, evitando la schiuma, in una bottiglia con 90 ml di diluente. Scuotere questa e ogni successiva diluizione vigorosamente per 25 volte con una ampiezza di escursione di circa 30 cm. Ripetere questa procedura per ottenere progressivamente le diluizioni crescenti 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, a secondo del bisogno.

Metodo n. 2.

Strumentario e mezzi occorrenti:

1) Stomacher meccanico, funzionante a circa 230 colpi al minuto (r.p.m.) della capacità di 400 ml. (Colworth Stomacher 400 prodotto dalla A.I. Seward e Co. S.r.l., Blackfriare Road, London, o altro strumento simile).

2) Corredo di sacchetti a parete sottile, misura 200, di polietilene (18 × 30 cm circa) sterili.

3) Lo stesso strumentario previsto ai numeri 3) e 4) del 1° metodo.

4) Corredo di pipette da 1,0 e 10,0 ml sterili.

5) Forbici sterili.

6) Diluente: acqua triptonata (n. 6) metodo n. 1) distribuita in bottiglie (flaconi) in ragione di 90 ml.

Procedimento:

1) Iniziare le operazioni il più presto possibile dopo il prelievo del campione.

2) Pesare in sacchetto tarato di polietilene la quantità del materiale necessaria per l'analisi. I campioni congelati non abbisognano di essere scongelati a meno che ciò sia necessario per la pesata dell'unità campionaria. Se è necessario lo scongelamento, ottenerlo nei contenitori originali (o nei recipienti in cui il materiale è stato recapitato al laboratorio) *lasciando per il tempo necessario in* frigorifero a +2/+5°C. Procedere oltre non appena si è raggiunto un grado sufficiente (anche se non completo) di scongelamento che permetta le operazioni successive.

3) Aggiungere il diluente 9 : 1 rispetto al quantitativo di materiale introdotto nel sacchetto, onde ottenere la diluizione 10^{-1}.

4) Se si sospetta la presenza di microrganismi patogeni, introdurre il sacchetto in un altro sacchetto, come precauzione contro eventuali rotture.

5) Collocare il sacchetto nello « Stomacher » e far agire lo strumento per 60".

6) Lasciare in quiete l'omogeneizzato per 15' a temperatura ambiente per promuovere la rivivificazione dei microrganismi.

7) Scuotere vigorosamente a mano il sacchetto, tagliarlo ad una estremità con le forbici e trasferire 10 ml in bottiglia con 90 ml di diluente onde ottenere la diluizione 10^{-2}.

8) Scuotere vigorosamente la diluizione 10^{-2} con 25 colpi, ampiezza dell'escursione di almeno 30 cm, e procedere allo stesso modo per le successive diluizioni.

d) *Terreni.*

I terreni colturali vanno conservati a +4°C ad eccezione di quelli con le campanule di Durham e per un periodo non superiore a 3 settimane, salvo indicazioni particolari. I terreni colturali contrassegnati con asterisco, come già precisato, sono reperibili in commercio in forma disidratata.

1) LATTE.

A) *Latte a lunga conservazione* (sterilizzato).

B) *Latte a media conservazione* (UHT):

1) Preincubazione;

2) Numerazione totale delle colonie:

a) flora aerobica (a +32°C);

b) termofili (a +55°C).

1) *Preincubazione.*

I contenitori prelevati vengono suddivisi in due serie di egual numero di pezzi una delle quali viene posta a +32°C ± 1° per 14 giorni e l'altra a +55°C ± 1° per 7 giorni.

2) *Numerazione totale delle colonie.*

a) Numerazione della flora aerobica (a +32°C). Terreno liquido nutritivo distribuito in provette (ml 10 per provetta) così costituito:

Estratto di lievito	g	2,5
Triptone	»	5,0
Destrosio	»	1,0
Acqua distillata fino a	ml	1000

Sterilizzare 15' a 120°C, pH 7 ± 0,2 dopo sterilizzazione.

Modo di operare.

Distribuire il latte già preincubato nel seguente modo:

1) ad una serie di 3 provette aggiungere asetticamente 1 ml di latte tal quale cadauna;

2) ad una seconda serie di 3 provette aggiungere asetticamente 0,1 ml di latte tal quale cadauna;

3) ad una terza serie di 3 provette aggiungere 0,1 ml di latte diluito 1:10.

Incubare tutte le provette a +32°C per 48h ± 3h.

Al termine dell'incubazione, dalle provette dalle quali non è possibile individuare se è avvenuto o meno sviluppo microbico, praticare una sottocoltura insemenzando 1 ansata in una provetta dello stesso terreno nutritivo, coltivare a +32°C ± 1°C per 24h controllare la eventuale crescita microbica.

Lettura dei risultati = confrontare la tabella del M.P.N.; non deve essere superato il valore di 11 microrganismi per 1,0 ml.

Numerazione della flora termofila (a +55°C).

Operare come in *a*) incubando a +55°C ± 1.

C) *Latte a breve conservazione* (pastorizzato) (1).
Numerazione dei coliformi.

Terreno di coltura:

a) brodo bile verde brillante (*):

Peptone	g	10
Lattosio	»	10
Bile di bue disidratata e purificata	»	20
Verde brillante	»	0,0133
Acqua distillata fino a	ml	1000

pH 7,4 ± 0,2; distribuire in provette con campana di Durham in ragione di 10 ml per provetta.
Sterilizzare a 120°C per 15'.

b) Agar eosina bleu di metilene (Levine) (*):

Peptone	g	10
Lattosio	»	10
Fosfato bipotassico (K_2HPO_4)	»	2
Agar	»	15
Eosina Y	»	0,4
Bleu di metilene	»	0,065
Acqua distillata	ml	1000

pH 6,8 - Distribuire in provette in ragione di ml 15 per provetta. Sterilizzare a 121°C per 15' - Distribuire in piastre Petri previa fusione in bagnomaria. Incubare le piastre a +32°C ± 1°C per 24h.

c) Agar nutritivo (*):

Estratto di carne	g	3
Peptone	»	5
Agar	»	15
Acqua distillata fino a	ml	1000

Scaldare fino ad ebollizione per disciogliere gli ingredienti. Distribuire in provette (10 ml ciascuna) e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'. Lasciare solidificare a becco di clarino. La reazione finale dovrà corrispondere a pH 6,8/7,0.

Brodo lattosato (*):

Estratto di carne	g	3
Peptone o polipeptone	»	5
Lattosio	»	5
Acqua distillata fino a	ml	1000

Disciogliere gli ingredienti e distribuire in provette con campanule Durham (10 ml ciascuna). Autoclavare a 120°C per 15'. pH finale 7,0 ± 0,1.

Modo di operare.

Insemenzare asetticamente le seguenti serie di provette contenenti brodo bile verde brillante:

1) 3 provette con 1 ml di materiale tal quale cadauna;
2) 3 provette con 0,1 ml di materiale tal quale cadauna;
3) 3 provette con 0,1 di materiale diluito 1:10 cadauna.

Incubare a 32°C ± 1°C per 48h ± 2h.

Lettura dei risultati: si assume come criterio di presunta positività lo sviluppo batterico con la formazione di gas nelle campanule di Durham. Prima di procedere alla valutazione del M.P.N., è necessario confermare, per ogni provetta in cui si sia avuta crescita, che si tratti di coliformi (prova di conferma).

A tal fine, procedere come segue:

Prova di conferma per la presenza di coliformi.

Prova completa.

Da ogni provetta con saggio presuntivo positivo eseguire delle sottocolture per strisciamento su piastra di agar all'eosina blu di metilene di Levine in modo di ottenere crescita di colonie ben separate le une dalle altre. Incubare le piastre per 24h a +32°C ± 1°C. Da una piastra scegliere una o più colonie tipiche e trapiantarle in provetta a becco di clarino di agar nutritivo e in una provetta con brodo lattosato con campanule Durham. Se si sono sviluppate solo colonie atipiche ripetere le stesse operazioni partendo da almeno tre di esse scelte tra le più sospette.

Incubare la coltura in agar per 24h e quella in brodo lattosato per 48h a + 32°C ±1°C. Lo sviluppo con comparsa di gas entro 48 h nel brodo lattosato e lo sviluppo in agar nutritivo di colonie o patina batterica costituite di cellule Gram negative, bastoncellari, non formanti spore, esprimono la positività della prova di conferma. Valutazione del numero di coliformi: confrontare con la tabella del M.P.N. considerando solo le provette in cui sono state positive le prove di conferma per i coliformi.

(1) Reazione della fosfatasi negativa determinata secondo la metodica riportata in appendice.

D) *Latte in polvere per l'alimentazione della prima infanzia:*

1) Ricostituzione del latte in polvere.
2) Numerazione delle colonie (flora aerobica a +32°C) (1).
3) Ricerca dei coliformi.
4) Ricerca dello Staphylococcus aureus.
5) Ricerca delle Salmonelle.

1) *Ricostituzione del latte* (diluizione 10^{-1}).

Il latte in polvere deve essere ricostituito con acqua triptonata. Procedere come segue:

1) Riscaldare un flacone (bottiglia di diluizione) contenente 90 ml di diluente a 47°C ± 2°C, in bagnomaria.

2) Pesare 10 g di latte in polvere in un recipiente di vetro sterilizzato, procedere con precauzioni di asepsi.

3) Introdurre la polvere nella bottiglia di diluizione contenente il diluente intiepidito a 47°C ±2°C.

4) Per far sciogliere la polvere, bagnarla facendo ruotare la bottiglia lentamente, poi scuotendo dolcemente 25 volte con escursione di circa 30 cm.

5) Delle sfere di vetro possono contribuire ad una migliore ricostituzione del latte. Quando si usano occorre aggiungerle alle bottiglie di diluzione prima della sterilizzazione

6) Riporre la bottiglia col latte in bagno maria e tenerla per 5' scuotendo il contenuto ripetutamente.

7) Il volume finale del latte ricostituito risulterà di circa 97,5 ml (e non di 100 ml), ma la piccola differenza è trascurabile.

Allestimento delle diluizioni.

Per allestire le diluizioni successive (10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, ecc.) con una pipetta sterile trasportare 10 ml del latte ricostituito in 90 ml di diluente sterile, avendo cura di non affondare l'estremità della pipetta più di 1 cm al di sotto della superficie del liquido. Si ottiene così la diluizione 10^{-2}. Mescolare *more solito* agitando 25 volte e procedere come già descritto, cambiando pipetta ogni volta, per le diluizioni successive.

2) *Numerazione delle colonie* (flora aerobica a +32°C).

Preparazione ed incubazione delle piastre.

Impiegare, per il trasferimento delle diluizioni in piastra, pipette da ml 1 cambiando pipetta per ogni singola diluizione presa in considerazione.

Sottoporre ogni diluizione prima dell'insemenzamento ad energica agitazione manuale prima del prelievo. Lasciare defluire il millilitro di inoculo per gravità in piastre di Petri del diametro interno di cm 10 circa.

Per ogni diluizione si allestiscono due piastre senza procedere al cambio della pipetta.

Si aggiungono, in ogni piastra, immediatamente dopo aver collocato l'inoculo 15 ml di agar nutritivo (vedi oltre) fuso e tenuto alla temperatura di circa +45°C avendo cura di mescolare accuratamente l'inoculo al terreno, le piastre vanno incubate a +32°C ± 1°C per 48h ± 3h e quindi si procede alla lettura.

Composizione del terreno nutritivo per conteggio batterico (*):

Estratto di lievito	g	2,5
Triptone	»	5
Destrosio	»	1
Agar	»	15
Acqua distillata	ml	1000

Distribuire in provettoni nella misura di ml 15 circa/provettone; pH — 7,0 dopo sterilizzazione ± 0,2.

Disciogliere il terreno colturale in b.m. bollente; raffreddare i provettoni alla temperatura di circa 50°C e porli in un b.m. a 45°C ±1° fino al momento dell'uso. La permanenza del terreno a 45°C non deve superare i 60'.

(1) Per i latti sottoposti a fermentazione biologica va eseguita anche la numerazione sul terreno al gelisato come per i gelati.

Al fine di assicurarsi della sterilità del terreno colturale e della soluzione diluente, allestire due piastre con il solo terreno colturale e due piastre con il terreno colturale addizionato di ml 2 di diluente.

Prelevare tale diluente da una bottiglia per diluizioni appartenente allo stesso lotto di quelle impiegate per le diluizioni scalari del campione in esame.

Incubare tali piastre a 32°C ± 1° per 48h ± 3, unitamente alle altre.

Lettura.

Eseguire il conteggio delle colonie sviluppatesi non oltre 3 ore dopo la scadenza del periodo di incubazione. Se ciò non fosse possibile, le piastre possono venire conservate a 4°C, per un periodo comunque non superiore a 24 ore.

Prendere in considerazione solo le piastre in cui si è sviluppato un numero di colonie compreso tra 30 e 300.

Non prendere in considerazione le piastre in cui sono presenti veli batterici superficiali o zone di crescita massiva in profondità che interessano più della metà dell'area della piastra.

Verranno eliminate anche quelle piastre in cui detta invasione batterica è inferiore alla metà dell'area della piastra, ma è accompagnata da zone di mancato sviluppo batterico (fenomeni da antibiosi).

Eseguire la numerazione con idoneo apparecchio conta/colonie, possibilmente corredato da un registratore di conteggio.

Interpretazione dei risultati.

Eseguire la media aritmetica dei singoli conteggi validi rilevati e approssimarla, per eccesso o per difetto; il risultato ottenuto, moltiplicato per il reciproco della corrispondente diluizione, rappresenta il numero di colonie batteriche presenti in ml 1 di latte ricostituito.

Nella numerazione delle colonie si possono, a volte, verificare delle particolari condizioni per cui si rendono necessari alcuni accorgimenti ai fini di una esatta valutazione dei risultati:

a) Tutte le piastre allestite presentano un numero di colonie maggiore di 300: prendere in considerazione unicamente le piastre relative alla maggiore diluizione e riportare il conteggio come maggiore del reciproco di tale diluizione moltiplicato per 300.

Esempio: dil. 1:100 = colonie contate 520; numero colonie/g > 30.000.

b) Tutte le piastre allestite presentano un numero di colonie inferiore a 30: prendere in considerazione unicamente le piastre relative alla minore diluizione e riportare il conteggio come minore del reciproco di tale diluizione moltiplicato per 30.

Esempio: dil. 1:10 = colonie contate 16; numero colonie/g < 30.

c) Unicamente una delle due piastre allestite, relativamente ad una determinata diluizione, presenta un numero di colonie compreso nel limite di 30-300: prendere in considerazione anche l'altra piastra non valida ed eseguire la media aritmetica dei singoli conteggi rilevati.

Esempio: dil. 1:10 =

I piastra colonie contate 280 (media aritm.).
II piastra colonie contate 312 (296).
Numero colonie/g = 3000.

d) Interpretazione dei risultati validi ottenuti da due diluizioni decimali consecutive: eseguire la media aritmetica dei singoli conteggi relativi ad ogni diluizione; fare il rapporto dei due risultati ottenuti e osservare se è $\gtreqless$ a 2; indi attenersi alle seguenti regole:

rapporto ≧ 2/prendere in considerazione unicamente il risultato più basso ottenuto;
rapporto < 2/eseguire la *media aritmetica* dei due risultati ottenuti.

Esempio:

Conteggio medio dil. 1/10	Conteggio medio dil. 1/100	Rapporto	Numero colonie/g
162	57	3,5	1.600
220	44	2	2.200
239	41	1,7	3.200

Ai fini della valutazione della carica microbica della partita in esame, il risultato è stabilito calcolando la media dei risultati relativi a ciascuna unità costituente il campione.

3) Ricerca dei coliformi

Per la ricerca dei coliformi procedere come segue: per ogni unità campionaria insemenzare ml 10 del prodotto ricostituito (1/10) in provetta con campana di Durham contenente 10 ml di brodo bile verde brillante a doppia concentrazione.

Incubare a 32°C ± 1°C per 48h ± 2h e in caso di prova presuntiva positiva procedere alla prova di conferma come indicato per il latte pastorizzato.

4) Ricerca dello Staphylococcus aureus.

Terreno di Giolitti e Cantoni.

Formula di base:

Triptone	g	10
Estratto di carne	»	5
Estratto di lievito	»	5
Cloruro di litio	»	5
Mannitolo	»	20
Cloruro di sodio	»	5
Glicina	»	1,2
Piruvato di sodio	»	3
Acqua distillata	ml	1000

Far sciogliere i vari ingredienti nell'ordine nell'acqua, riscaldare ed agitare fino ad ottenere una soluzione completa. Far raffreddare a 50-60°C ed aggiustare il pH a 6,9 ± 0,1. Distribuire in ragione di 19 ml in provette da 20 × 200 mm. Autoclavare per 20' a 115°C.

Contemporaneamente allestire anche la base a doppia concentrazione e distribuirla nelle provette 20 × 200 in ragione di 10 ml ciascuna.

La base a doppia concentrazione si allestisce allo stesso modo, impiegando per lo stesso volume finale (1000 ml) gli ingredienti in dose raddoppiata.

La base a doppia concentrazione si distribuisce in provette da 20 × 200 mm in ragione di 10 ml per ogni provetta.

Soluzione di tellurito di potassio:

Tellurito di potassio	g	1
Acqua distillata	ml	100

Sciogliere il tellurito di potassio nell'acqua, sterilizzare la soluzione per filtrazione. Per una buona riuscita delle ricerche occorre far uso di tellurito di potassio per uso batteriologico di provata efficacia. (Quello prodotto dalla BDH sembra particolarmente raccomandabile).

La soluzione di tellurito di potassio va aggiunta in ragione di 0,1 ml in ogni provetta previa rigenerazione della base (a concentrazione normale o a concentrazione doppia) da eseguirsi poco prima dell'impiego del terreno tenendo immerse per pochi minuti in bagnomaria bollente le provette da insemenzare e quindi raffreddandole a circa 45°C in acqua fredda.

Modo di procedere per le semine.

Nella provetta contenente il terreno di Giolitti e Cantoni a doppia concentrazione, completate con il tellurito, insemenzare 10 ml di latte ricostituito (dil. 10^{-1} corrispondente a 1 g di polvere). Poichè le unità campionarie da indagare sono 5, l'operazione va ripetuta 5 volte insemenzando ogni volta una provetta con 10 ml del latte dell'unità campionaria corrispondente. Terminata l'operazione della semina, versare sopra la colonna liquida, uno strato di 2-3 cm di gel di agar sterile al 2%, previamente reso fuso in bagnomaria bollente e lasciando solidificare prima di riporre le provette in termostato.

Le provette debbono essere incubate a 37°C ± 1°C per 24h; la crescita *presuntiva* degli stafilococchi è denunciata da un annerimento della colonna liquida o dalla formazione di un precipitato nerastro. Le provette che dopo 24h non hanno dato sviluppo, vanno reincubate per altre 24h (complessivamente 48h).

Prova di conferma.

Dalle colture di cui sopra, risultate presuntivamente positive, eseguire semine per strisci multipli sul terreno colturale di Baird-Parker E.T.G.P.A. (*), preparato nella seguente maniera:

Formula di base:

Triptone	g	10
Estratto di carne di bue	»	5
Estratto di lievito	»	1
Cloruro di litio	»	5
Agar (secondo il potere gelificante dello agar utilizzato)	»	12-15
Acqua distillata	ml	1000

Sciogliere gli ingredienti nell'acqua riscaldando e agitando fino ad ottenere una dissoluzione completa. Raffreddare a 50-60°C ed aggiustare il pH a 6,8 ± 0,1.

Soluzione di glicina:

Glicina	g	20
Acqua distillata	ml	100

Dopo completa soluzione, autoclavare per 15' a 121°C.

Soluzione di tellurito di potassio:

Tellurito di potassio	g	1
Acqua distillata	ml	100

Dopo completa soluzione, sterilizzare per filtrazione. Ricorrere a tellurito di potassio sperimentalmente controllato (consigliabile quello preparato dalla BDH).

Emulsioni di tuorlo d'uovo (*).

Lavare accuratamente il guscio delle uova (fresche) con spazzola e acqua saponata. Immergerle per alcuni minuti in alcool etilico a 70°. Estrarle, farle scolare e infiammare la piccola quantità di alcool residuo.

Rompere i gusci asetticamente e separare il tuorlo dall'albume. Miscelare i tuorli con soluzione salina fisiologica (3 volumi di tuorlo + 7 volumi di soluzione salina sterile allo 0,85% di Na Cl) per 5" in un miscelatore ad alta velocità.

Allestimento finale del terreno.

A 90 ml di base previamente fatta fondere e tenuta a 45°C ± 1° aggiungere asetticamente le soluzioni seguenti, anch'esse preriscaldate a 45°C:

a) 6,3 ml della soluzione di glicina;

b) 1,0 della soluzione di tellurito di potassio;

c) 5,0 della emulsione di tuorlo d'uovo.

Mescolare bene le preparazioni *a)*, *b)*, *c)*, nel terreno fuso e versare immediatamente in piastre di Petri in ragione di 15 ml per ognuna. Le piastre così preparate possono essere conservate per 3 settimane in frigorifero a +4°C.

Immediatamente prima di utilizzarle, spatolare sulla superficie del terreno 0,5 ml di una soluzione al 20% (p/v) di piruvato di potassio sterilizzata per filtrazione. Far asciugare bene le piastre a 50°C, in posizione orizzontale, tenendo la superficie dell'agar rivolta verso l'alto. Inoculare le piastre quando sono ben asciugate. La soluzione di piruvato deve essere conservata a 3-5°C e sostituita ogni mese (3).

Aprire le provette di terreno di arricchimento di Giolitti e Cantoni (presuntivamente positive dopo 24h o al massimo 48h di incubazione a 37°C) frammentando asetticamente il tappo di gel di agar solidificato sopra la colonna liquida. Con ansa di platino, insemenzare per ogni provetta una piastra di terreno E.T.G.P.A. di Baird-Parker. Mettere le piastre insemenzate in termostato alla temperatura di 37°C ± 1°C. Per la lettura dei risultati procedere come segue:

la prima lettura è consigliabile sia fatta dopo 30 ore di incubazione a 37°C ± 1°C. Dopo questo intervallo di tempo, sulle piastre con giusta densità di sviluppo (20-200 colonie) le colonie nere splendenti, con stretta orlatura biancastra, attorniate da un alone di chiarificazione che si addentra nel mezzo opaco, sono da ritenersi con quasi assoluta certezza dovute allo *Staphylococcus aureus*. Le piastre debbeno poi essere incubate per altre 18 ore a 35-37°C. Dopo questo secondo periodo di tempo occorre non trascurare le colonie che saranno comparse dopo la prima lettura, con caratteri tipici analoghi alle precedenti ed anche quelle con caratteri atipici (assenza di alone di chiarificazione, mancanza dell'orlatura biancastra, alone opaco senza chiarificazione, ecc.).

Un numero rappresentativo anche di queste ultime dovrà essere sottoposto alla definitiva conferma della prova della coagulasi.

Le colonie tipiche ed anche quelle sospette (atipiche) sviluppatesi sull'E.T.G.P.A. di Baird-Parker vengono trapiantate, per la successiva dimostrazione della coagulasi, in provette di terreno liquido (brodo all'infuso di cervello e di cuore) (*) avente la seguente composizione:

Infuso di cervello di vitello disidratato	g	12,5
Infuso di cuore di bue disidratato	»	5
Proteose peptone	»	10
Destrosio	»	2
Cloruro di sodio	»	5
Fosfato bisodico	»	2,5
Acqua distillata	ml	1000

pH 7,4 - Distribuire in provette in ragione di ml 5/provetta sterilizzare a 121°C per 15 Incubare le semine a 37°C ± 1°C per 24 ore.

Sottoporre le brodocolture al seguente accertamento:

Ricerca della coagulasi.

Come è noto, tale ricerca evidenzia l'attività coagulante esercitata dagli stafilococchi potenzialmente patogeni sul plasma di coniglio.

Poichè i fattori accessori della coagulazione presenti nel plasma vanno incontro a rapido deterioramento, è consigliabile impiegare plasma liofilizzato da ricostituire al momento dell'uso.

La ricerca viene effettuata come segue:

a ml 0,5 di plasma di coniglio all'EDTA(*) o all'ossalato, aggiungere 2 gocce della brodocoltura in esame.

Quale controllo impiegare ml 0,5 della soluzione di plasma addizionato di 2 gocce di terreno colturale non inoculato. Incubare a 37°C ± 1°C per 4-24 ore.

Lettura.

Particolare importanza riveste la interpretazione dei risultati ottenuti nel corso di tale ricerca. È noto, infatti, che il plasma posto a contatto con stafilococchi non produttori di enzima mantiene inalterata la sua fluidità (ricerca negativa), mentre se posto a contatto con stafilococchi produttori di enzima, coagula completamente e tale coagulo non si sposta allorchè la provetta, nella quale è stata condotta la prova, viene capovolta (ricerca positiva).

Tuttavia tra questi due estremi di comportamento si possono rilevare reazioni intermedie che vanno dalla presenza di coaguli di piccole dimensioni, non organizzati, simili a precipitati rilevabili sul fondo della provetta, alla presenza di coaguli, organizzati di dimensioni variabili e rilevabili invece nella zona alta del mezzo.

Alla ricerva potrà essere dato anche un significato quantitativo a seconda delle dimensioni del coagulo formatosi; pertanto sulla stregua di quanto sopra riferito, si ritiene opportuno precisare la seguente scala convenzionale di lettura:

Reazione negativa (—) = completa fluidità del mezzo con assenza di coaguli organizzati o presenza di coaguli di piccole dimensioni, non organizzati e depositati sul fondo della provetta.

Reazione positiva (+) = presenza di un coagulo organizzato di piccole dimensioni rilevabile nella zona alta del mezzo che conserva, in gran parte, la sua fluidità.

Reazione positiva (++) = presenza di un coagulo organizzato già di notevoli dimensioni facilmente rilevabile nella parte alta e centrale del mezzo che conserva, in parte, la sua fluidità.

Reazione positiva (+++) = il mezzo si presenta completamente coagulato e ciò è facilmente rilevabile poichè il coagulo non si sposta con il capovolgimento della provetta.

Le letture vengono eseguite dopo 4 ore; la presenza di un coagulo organizzato come sopra descritto mette in evidenza l'attività coagulasica del germe in questione. In caso di negatività, le letture vengono ripetute al termine di 24 ore di incubazione.

5) RICERCA DELLE SALMONELLE.

Arricchimento primario selettivo:

1) Ricostituire 100 g di polvere di latte in un litro di acqua sterile. Se il pH risulta inferiore a 6,6 portarlo a 6,8 - 7,0. L'operazione va fatta in un matraccio sterile da due litri.

2) Aggiungere 20 ml di una soluzione acquosa allo 0,1% di verde brillante (concentrazione finale da raggiungere nel latte ricostituito 1:50.000).

3) Incubare il matraccio a 37°C per 18-24h. Al termine della incubazione e prima di passare ai tempi successivi eseguire le prime sottocolture per strisciamento sui terreni solidi selettivi.

(3) Nelle preparazioni disidratate del commercio il piruvato è già incluso nella formula della base e pertanto non deve essere ulteriormente aggiunto. Le piastre allestite con i terreni del commercio hanno una durata limitata di 3-4 giorni, se conservate in frigorifero.

Arricchimento secondario selettivo:

1) Trasferire con pipetta, previa agitazione del matraccio, 10 ml della coltura di arricchimento primario selettivo rispettivamente in 100 ml di brodo al tetrationato verde brillante ed in 100 ml di brodo selenito cistina.

La formula di preparazione del terreno al tetrationato al verde brillante è la seguente:

Terreno al tetrationato al verde brillante (Müller-Kauffmann).

a) *Terreno di base:*

composizione:

Estratto di carne	g	5,0
Peptone	»	10,0
Cloruro di sodio	»	3,0
Carbonato di calcio	»	45,0
Acqua distillata	ml	1000

preparazione:

aggiungere all'acqua i componenti di base disidratati o il terreno di base in toto già disidratato, portare all'ebollizione fino alla soluzione dei componenti solubili.

Aggiustare il pH in modo che dopo la sterilizzazione corrisponda a 7,0 ± 0,1 a 20°C. Sterilizzare la base per 20′ a 121°C.

b) *Soluzione di tiosolfato di sodio:*

composizione:

Tiosolfato di sodio ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)	g	50,0
Acqua distillata q.b. a.	ml	100,0

preparazione:

sciogliere il tiosolfato di sodio in una parte di acqua.

Portare al volume finale con altra acqua. Sterilizzare la soluzione per 20′ a 121°C.

c) *Soluzione di iodio:*

composizione:

Iodio	g	20,0
Ioduro di potassio	»	25,0
Acqua distillata q.b. a.	ml	100

preparazione:

sciogliere lo ioduro di potassio in un piccolo volume di acqua ed aggiungervi lo iodio. Agitare fino a soluzione completa Portare al volume finale, senza riscaldare.

Conservare la soluzione in un recipiente di vetro scuro con tappo a smeriglio.

d) *Soluzione di verde brillante:*

Composizione:

verde brillante	g	0,5
acqua distillata	ml	100,0

preparazione:

aggiungere il verde brillante all'acqua.

Conservare la soluzione almeno una giornata all'oscuro per provocare l'autosterilizzazione.

e) *Soluzione di bile di bue:*

composizione:

bile di bue essiccata	g	10,0
acqua distillata	ml	100,0

preparazione:

sciogliere la bile di bue secca in acqua portando ad ebollizione.

Sterilizzare la soluzione per 20′ a 121°C.

Terreno completo:

composizione:

Terreno di base	ml	900
Soluzione di tiosolfato di sodio	»	100
Soluzione di iodio	»	20
Soluzione di verde brillante	»	2
Soluzione di bile di bue	»	50

preparazione:

aggiungere al terreno di base gli altri componenti nello ordine elencato, con precauzione di asepsi.

Mescolare bene il liquido dopo ogni addizione.

Travasare sterilmente 500 ml di terreno completo, con cautela di asepsi, in matracci o flaconi sterili della capacità di 1000 ml (1).

Conservare a 4°C all'oscuro, fino al momento dell'impiego.

Il terreno non si conserva più di una settimana.

La formula di preparazione del terreno al *selenito cistina* è la seguente:

BRODO AL SELENITO DI CISTINA (*).

Terreno di base:

composizione:

Triptone	g	5
Lattosio	»	4
Fosfato bisodico ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	»	10
Selenito acido di sodio	»	4
Acqua distillata	ml	1000

preparazione:

sciogliere gli ingredienti (o tutta la base disidratata) nella acqua facendo bollire per 5′.

SOLUZIONE DI L-CISTINA:

composizione:

l-cistina	g	0,1
sol. N/1 di idrossido di sodio (NaOH)	ml	15,0

preparazione:

portare a 100 ml con acqua distillata senza passare in autoclave.

TERRENO COMPLETO.

Raffreddare il terreno di base e aggiungere la soluzione di cistina in ragione di 0,1 ml/10 ml di base. Aggiustare il pH a 7,0 ± 0,1 a 20°C. Travasare il terreno completo nei quantitativi di uso in recipienti sterili (2). Incubare ambedue le colture di arricchimento secondario in termostato a 37°C per 18-24h procedere quindi come segue:

sottocolture di isolamento su piastra di terreni solidi selettivi.

Formule di terreni.

AGAR VERDE BRILLANTE (*) (SGA):

Estratto di lievito	g	3,0
Proteose peptone o polipeptone	»	10,0
Cloruro di sodio	»	5,0
Lattosio	»	10,0
Saccarosio	»	10,0
Rosso fenolo	»	0,08
Verde brillante	»	0,0125
Agar	»	20,0

Allestimento.

Sospendere gli ingredienti in 1 litro di acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione, agitando frequentemente, per ottenere una completa dissoluzione. Raffreddare a 50-60°C ed aggiustare la reazione in modo che il pH finale risulti di 6,9 ± 0,1. Distribuire in matracci o in provettoni. Autoclavare a 121°C per 12′ (il riscaldamento più prolungato fa diminuire la selettività del mezzo e quello più abbreviato ne aumenta la selettività).

Letture dei risultati. — Le colonie tipiche delle Salmonelle su questo terreno appaiono incolori, rosa fino al color fucsia, traslucenti o opache contornate da una zona dal rosa al rosso nel terreno circostante. Quando sono circondate da colonie ravvicinate di microrganismi che fermentano il lattosio o il saccarosio possono presentarsi verdi traslucide.

---

(1) A secondo dell'uso si possono distribuire quantità differenti in provette, provettoni, matracci, bottiglie.

(2) Nelle preparazioni disidratate del commercio la l-cistina per solito è già inclusa ed il terreno completo si ottiene idratando direttamente la polvere, secondo le istruzioni della casa produttrice.

AGAR DESOSSICOLATO CITRATO LATTOSIO (terreno di Leifson mod. da Hynes):

Estratto di carne	g	5,0
Proteose peptone (o equivalente)	»	5,0
Lattosio	»	10,0
Citrato di sodio.	»	8,5
Tiosolfato di sodio	»	8,5
Citrato di ferro ammoniacale (o citrato ferrico)	»	1,0
Desossicolato di sodio	»	5,0
Rosso neutro	»	0,025
Agar.	»	12-15 (a seconda del potere gelificante)
Acqua distillata	g	1000

pH finale = 7,3

Allestimento (1).

1) Sciogliere l'estratto di carne in 200 ml di acqua distillata, far bollire ed aggiustare il pH a 7,3. Aggiungere a questa soluzione il proteose peptone e sterilizzare a 121°C per 20 minuti.

2) Sciogliere a caldo l'agar in 800 ml di acqua distillata. Mescolare le soluzioni di cui sopra ed aggiungervi ml 1,25 di una soluzione di rosso neutro al 2% e g 10 di lattosio. Ripartire in matracci in ragione di 100 ml cadauno. Sterilizzare a vapore fluente per un'ora e quindi a 115°C per 10 minuti.

Al momento dell'uso far fondere a bagnomaria ed aggiungere ad ogni matraccio ml 5, rispettivamente, delle seguenti soluzioni *A* e *B* e versare quindi in piastra di Petri.

Soluzione A:

Citrato di sodio	g	17
Tiosolfato di sodio	»	17
Citrato di ferro (o ferro ammoniacale)	»	2
Acqua distillata	ml	100

Soluzione B:

Desossicolato di sodio	g	10
Acqua distillata	ml	100

Le soluzioni *A* e *B* non vanno sterilizzate.

Procedimento.

1) Allestire le piastre di terreno solido di isolamento avendo cura di far asciugare accuratamente (in termostato o stufa ad aria calda) le superfici di semina.

2) Strisciare un'ansata delle colture di arricchimento selettivo sulla superficie ben asciutta di entrambi i terreni solidi di isolamento; procedere in modo da poter ottenere colonie non confluenti, tra loro ben isolate.

3) Incubare le piastre (rovesciate) in termostato a 35-37°C per 24h. Se al termine di tale intervallo non si notano sviluppi tipici o sospetti, reincubare le piastre alla stessa temperatura ed esaminarle dopo altre 24 ore.

4) Da ogni piastra isolare su agar nutritivo a becco di clarino tre o più colonie tipiche e/o sospette, per sottoporre gli stipiti isolati alle successive prove di identificazione.

5) Le piastre da cui si sono isolati gli stipiti da studiare vanno conservate in frigorifero a +5°C, fino al termine delle operazioni di identificazione.

Procedere poi come già descritto a proposito del latte in polvere.

Lettura:

Colonie rosse con centro nero = citrobatteri o certi stipiti Arizona (generalmente sviluppano in 48h).

Colonie rosse = coliformi lattosio positivi.

Colonie biancastre con centro rosso = coliformi lattosio positivi lenti fermentatori.

Colonie incolori e biancastre = enterobatteri lattosio negativi e idrogeno solforato negativi (shigelle o salmonelle SH_2 negative; Proteus SH_2 negativo; varietà lattosio negativa dei coliformi e coliformi lenti fermentatori).

(1) Per meglio garantirsi della riproducibilità dei risultati è consigliabile far ricorso alle preparazioni disidratate di buona marca ed allestire seguendo le istruzioni della casa produttrice.

Colonie incolori con centro nero = enterobatteri lattosio negativi e idrogeno solforato positivi (salmonelle SH_2+ e *Proteus hauseri.* Arizona; Citrobacter var. lattosio negativa, Bethesda.).

Colonie mucose, grandi, rosse che diventano biancastre = Klebsiella.

Colonie verdastre o brunastre = Pseudomonas pigmentate.

Colonie rosate pallido = *Proteus morganii, Shigella sonnei.*

Prove di conferma.

Le colonie riferibili a Salmonelle, sviluppatesi nei terreni solidi di isolamento e isolate su agar nutritivo a becco di clarino, vengono trapiantate in provette contenenti agar di Kligler (*) avente la seguente composizione:

Estratto di carne . .	g	3
Estratto di lievito .	»	3
Peptone pepsico	»	15
Proteose peptone	»	5
Lattosio . .	»	10
Destrosio	»	1
Ferro solfato (ferroso) . .	»	0,2
Cloruro di sodio . . .	»	5
Sodio tiosolfato .	»	0,3
Agar . . .	»	15
Rosso fenolo	»	0,024
Acqua distillata q.b. a . . .	ml	1000

pH 7,4 Distribuire in provette in ragione di 10 ml. Sterilizzare a 121°C per 15' Far solidificare a becco di clarino corto (1).

Tecnica: con ago prelevare la colonia in esame e seminarla in una provetta contenente il terreno di cui sopra, mediante strisciamento rettilineo in superficie e infissione perpendicolare fino al fondo nella massa del substrato.

Incubare le semine a 37°C ± 1°C per 24 ore.

Lettura: la presenza presuntiva di salmonelle è rilevata da:

— viraggio del terreno da rosso a giallo sul fondo della provetta (fermentazione del glucosio);

— intensificazione dell'arrossamento della superficie del becco di clarino (reazione alcalina), più raramente nessuna modificazione;

— produzione di gas salvo che per alcuni siero tipi;

— annerimento di varia intensità del terreno per produzione di idrogeno solforato nella zona di infissione, salvo che per alcuni sierotipi.

Le colture presentanti le caratteristiche descritte, vengono sottoposte ad accertamenti morfologici, previa colorazione del Gram, biochimici e sierologici onde procedere alla identificazione del *genere.*

1) RICERCA DELLA BETA-GALATTOSIDASI.

Sospendere un'ansata della coltura in Kligler in ml 0,25 di soluzione fisiologica; aggiungere una goccia di toluene e agitare.

Porre per pochi minuti a 37°C ± 1°C indi aggiungere ml 0,25 di una soluzione di ONPG (ortonitrofenil-galattopiranoside).

Porre in b.m. a 37°C ± 1° per 24 ore.

Reattivo ONPG:

a) Soluzione tampone di fosfato monosodico pH 7: sciogliere g 6,9 di fosfato monosodico in ml 45 di acqua distillata. Neutralizzare con una soluzione concentrata di idrato di sodio (circa 3 ml di una soluzione al 30%); portare a ml 50 con acqua distillata. Mantenere a 4°C.

b) Soluzione di ONPG M/75: sciogliere mg 80 di ONPG in ml 15 di acqua distillata precedentemente riscaldata a 50°C ± 1°. Far raffreddare e aggiungere ml 5 della soluzione tampone di cui in *a*). Mantenere la soluzione, che deve rimanere incolore, all'oscuro e a 4°C. Prima dell'uso porre tale soluzione a 37°C ± 1° onde ridisciogliere i fosfati eventualmente precipitati.

Lettura: la presenza di beta-galattosidasi viene evidenziata dalla comparsa di un colore giallo intenso che si manifesta, in genere, dopo 1-3 ore o al massimo, entro 24 ore di osservazione.

(1) Per meglio garantirsi della riproducibilità dei risultati è consigliabile far ricorso alle preparazioni disidratate di buona marca da allestire seguendo le istruzioni della casa produttrice.

2) Ricerca della fenil-alanina-piruvicasi (APP).

Sospendere un'ansata della coltura in Kligler in ml 0,5 di soluzione di L-fenilalanina allo 0,4%.
Incubare a 37°C per 10-15'.
Aggiungere 1-2 gocce del reattivo avente la seguente composizione:

Soluzione semi satura di allume ferrico . . .	ml	5
Solfato di ammonio	g	2
Acido solforico al 10%	ml	1

Lettura: la comparsa di una colorazione verde indicherà la avvenuta trasformazione della fenilalanina in acido fenilpiruvico.

3) Ricerca della lisina-decarbossilasi (LDC).

Dalla coltura in Kligler eseguire una semina nel terreno liquido di Falkow (*) avente la seguente composizione:

Peptone	g	5,0
Estratto di lievito	»	3,0
Glucosio	»	1,0
Cloridrato di l-lisina	»	5,0
Porpora di bromocresolo	»	0,015
Acqua distillata	ml	1000

Preparazione: sciogliere i componenti nell'acqua portando ad ebollizione.
Aggiustare il pH in modo che dopo la sterilizzazione, a 20°C corrisponda a 6,8 ± 0,1.
Distribuire il terreno in quantità di 5 ml in provette del diametro di circa 8 mm e lunghe circa 160 mm.
Sterilizzare per 10' a 121°C.

Lettura: la comparsa di una colorazione bleu-violetto indicherà l'avvenuta decarbossilazione della lisina.
Nella lettura è utile il raffronto con una provetta dello stesso terreno non insemenzato.

4) Utilizzazione del malonato (MAL) (*).

Dalla coltura in Kligler eseguire una semina nel terreno avente la seguente composizione: (*):

Estratto di lievito	g	1
Solfato di ammonio	»	2
Fosfato bipotassico	»	0,6
Fosfato monopotassico	»	0,4
Cloruro di sodio	»	2
Malonato di sodio	»	3
Glucosio	»	0,25
Bleu bromotimolo	»	0,025
Acqua distillata q.b. a	ml	1000

Distribuire in provette; sterilizzare a 121°C per 15'; incubare le semine a 37°C ± 1° per 48 ore.

Lettura: il viraggio del terreno colturale dal verde al bleu indicherà l'avvenuta utilizzazione del malonato.
Onde facilitare l'interpretazione dei risultati ottenuti dagli accertamenti biochimici descritti, può essere utile schematizzare in tabella il comportamento, di massima, dei gruppi di germi presi in esame.

TABELLA RIASSUNTIVA
DELL'ESITO DELLE PROVE BIOCHIMICHE

Accertamenti biochimici	Salmonella	Arizona	Shigella	Proteus	Providencia
B-galattosidasi .	—	(+/—)	(—/+)	—	—
APP	—	—	—	+	+
LDC	(+/—) (1)	+	—	/	/
MAL	—	+	/	/	/

(1) La *S. paratyphi A* è LDC negativa.

Espletate le prove suindicate, procedere agli accertamenti sierologici mediante le prove di agglutinazione.

II. — Prodotti d'uovo pastorizzati.

A) *Uova sgusciate, pastorizzate, congelate o refrigerate, tuorlo pastorizzato congelato, albume pastorizzato congelato:*

1) Numerazione totale delle colonie (flora aerobica a +32°C).
2) Ricerca delle salmonelle.

B) *Uova pastorizzate in polvere ed albume pastorizzato cristallizzato:*

1) Numerazione totale delle colonie (flora aerobica a +32°C).
2) Numerazione dei coliformi.
3) Ricerca delle salmonelle.

Procedimento.

I prodotti congelati saranno fatti scongelare, immergendo per il tempo strettamente necessario i loro contenitori in acqua fredda corrente. Usare la massima precauzione perché l'acqua non penetri nei contenitori. I contenitori, chiusi ermeticamente, dopo lo scongelamento saranno opportunamente agitati (o ruotati) per assicurare una buona miscelazione del contenuto.
I contenitori con il prodotto di campionamento non congelato (polvere d'uovo) devono essere agitati accuratamente onde ottenere una buona miscelazione del materiale prima di procedere al prelevamento dei quantitativi di semina.
Per ottenere le unità campionarie necessarie è opportuno non prelevare mai meno di 200 g di materiale da ogni contenitore scelto con criterio casuale. Tutte le unità prelevate (10) saranno utilizzate per la ricerca delle salmonelle. Tra esse sceglierne 5 a caso da sottoporre anche alla determinazione della carica microbica e dei coliformi.

Prelevamento dei quantitativi da esaminare.

Per le 5 unità campionarie che debbono essere indagate soltanto per le salmonelle pesare 25 g del materiale (polvere o fluido scongelato) nella coppa dell'omogeneizzatore o nel sacchetto dello Stomacher, precedentemente tarati ed introdurre asetticamente 225 ml di acqua peptonata tamponata.
Per le 5 unità campionarie da sottoporre anche ad altre indagini (carica microbica e ricerca dei coliformi) oltre che alla ricerca delle salmonelle pesare 30 g del materiale nelle coppe o sacchetti ed introdurre in esse asetticamente 270 ml dello stesso terreno (1). Sia nell'un caso come nell'altro si saranno raggiunte in tal modo le proporzioni per la diluizione a 10^{-1}.

Omogeneizzazione.

Procedere secondo le regole generali sia che si proceda con Mixer ovvero con Stomacher.

Numerazione della flora aerobica a +32°C.
Numerazione dei coliformi.

Preparazione delle diluizioni.

Dai matracci o flac. in cui sono stati separati 50 ml dell'omogeneizzato di uova o prodotti di uova a 10^{-1}, allestire con le metodiche già precisate e facendo uso dell'acqua triptonata all'1‰ (pH 7,0), convenienti diluizioni di uso (10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} ecc.).
Per le cariche microbiche (aerobiche) seguire la tecnica precisata a proposito del latte in polvere per l'alimentazione della prima infanzia.
Per la determinazione dei coliformi, adozione del metodo MPN in brodo verde brillante bile al 2%, impiegando serie di 3 provette per ognuna delle seguenti diluizioni: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}.

Ricerca delle salmonelle.

Principio: la dimostrazione delle Salmonelle necessita di quattro tempi successivi, a causa della relativa loro scarsa frequenza e della concomitante larga presenza di altre enterobatteriacee. I tempi da osservare nella ricerca sono i seguenti:

a) prearricchimento: in terreno nutritivo liquido non selettivo (temperatura di incubazione 37°C);
b) arricchimento: coltura del prearricchimento in due terreni liquidi selettivi, con successiva incubazione a 42-43°C e a 37°C;
c) sottocolture di isolamento dei liquidi di arricchimento sui terreni solidi selettivi in piastra, da incubare a 37°C;
d) identificazione delle colonie sospette sui terreni solidi selettivi, isolamento degli stipiti e successive prove per le determinazioni diagnostiche conclusive.

Terreni da impiegarsi:

per il prearricchimento: acqua peptonata tamponata;
per l'arricchimento: brodo di Müller Kauffmann al tetrationato; brodo selenito cistina;

---

(1) Tale modo di procedere consentirà con un'unica omogeneizzazione di ottenere 250 ml della diluizione a 10^{-1} per la ricerca delle salmonelle e 50 ml, sempre a 10^{-1}, da utilizzare per le indagini sulla carica microbica ed eventualmente per la ricerca dei coliformi con il metodo MPN.

per l'isolamento: agar verde brillante; agar citrato desossicolato, mod. Hynes;

per le identificazioni definitive: i terreni già descritti nel capitolo del latte in polvere;

per le sierotipizzazioni: sieri specifici polivalenti e monovalenti O e H (v.).

Terreno liquido per il prearricchimento.

Acqua peptonata tamponata, composizione:

Peptone	g	10,0
Cloruro di sodio	»	5,0
Fosfato bisodico ($Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$)	»	9,0
Fosfato monopotassico (KH_2PO_4)	»	1,5
Acqua distillata	ml	1000

Preparazione.

Far sciogliere i componenti nell'acqua, portando ad ebollizione. Aggiustare il pH in maniera da ottenere, dopo la sterilizzazione, il valore di 7,0 ± 0,1 a 20°C. Distribuire il terreno in quantità di 225 ml (e di 270 ml) in bottiglie della capacità di 500 ml. Sterilizzare in autoclave per 20' a 121°C.

Prearricchimento per le salmonelle.

Travasare con cautela di asepsi il contenuto delle coppe o dei sacchetti corrispondente all'omogeneizzazione di 25 g di materiale direttamente in matracci o bottiglie sterili della capacità di 500 ml.

Per gli omogeneizzati corrispondenti a 30 g di materiale (volume finale 300 ml) trasferire in recipienti sterili più piccoli 50 ml per le altre ricerche (carica microbica totale ed eventualmente coliformi) ed i restanti 250 ml in contenitori identici a quelli precedentemente usati. I flaconi con 50 ml di omogeneizzato vanno riposti in frigorifero per il breve tempo necessario fino all'inizio delle operazioni di semina (1).

Tutte le 10 bottiglie con l'omogeneizzato di 25 g di prodotto saranno incubate in termostato a 37° ± 1°C per non meno di 16h e per non più di 20.

Arricchimento.

Dopo il periodo di incubazione del prearricchimento trasferire 10 ml di ognuna delle 10 bottiglie in 1000 ml di brodo di Müller Kauffmann (ovvero in 2 matracci da 500 ml) e ripetere la stessa operazione per il brodo selenito cistina.

Incubare i matracci di brodo di Müller Kauffmann inoculati alla temperatura di 37°C fino ad un massimo di 48h.

Incubare i matracci di brodo selenito cistina inoculati alla temperatura di 42-43°C fino ad un massimo di 48h.

Per i matracci incubati a 42-43°C porre molta attenzione affinché il limite di 43°C non venga superato.

Colture di isolamento.

Dopo una incubazione di arricchimento di 18-24h con un'ansa del diametro di 2,5-3 mm, eseguire, da ogni matraccio, per strisciamento, sottocolture di isolamento (in duplicato) su piastre di:

Agar verde brillante;

Agar citrato desossicolato modificato secondo Hynes.

La stessa operazione va ripetuta al termine delle 48h ± 2 delle colture di arricchimento.

Incubare le piastre insemenzate a 37°C ± 1°C e procedere alle prime letture dopo 20-24h. Se si osserva scarso sviluppo o assenza di colonie sospette reincubare le piastre in termostato per altre 20-24h e procedere a nuova lettura.

Da ogni piastra, con colonie sospette, isolare 3 o più stipiti in agar nutritivo (provette a becco di clarino) ed, ottenuto sufficiente sviluppo dopo incubazione di 18-20 ore a 37°C, procedere alle successive prove di identificazione.

Conservare le piastre di isolamento, in frigorifero, fino alla conferma o la esclusione dell'appartenenza degli stipiti isolati al genus *salmonella*. In caso di dubbio reisolare altri stipiti da colonie sospette e ripetere le prove di identificazione.

---

(1) Si raccomanda che le diluizioni e le semine per la determinazione della carica microbica e per la determinazione dei coliformi (MPN) siano iniziate il più presto possibile dopo l'ottenimento dell'omogeneizzato.

L'isolamento delle salmonelle dalle sottocolture dei terreni di isolamento è indicativo della presenza della specie patogena in almeno una delle unità campionarie cumulate nelle semine di arricchimento.

A) *Uova sgusciate, pastorizzate, congelate o refrigerate, tuorlo pastorizzato congelato, albume pastorizzato congelato.*

1) *Numerazione totale delle colonie* (flora aerobica a +32°C) vedi latte in polvere per l'alimentazione della prima infanzia.

Per la preparazione delle diluizioni vedi quanto detto per la ricerca delle salmonelle, utilizzando lo stesso omogeneizzato.

2) *Ricerca delle salmonelle* (già descritta).

B) *Uova pastorizzate in polvere e albume pastorizzato cristallizzato.*

1) *Numerazione totale delle colonie* (flora aerobica a +32°C). Operare come previsto per il latte in polvere per l'alimentazione della prima infanzia partendo dalle diluizioni dell'omogeneizzato preparato per la ricerca delle salmonelle (nei prodotti congelati).

2) *Numerazione dei coliformi.* Operare come previsto per il latte a breve conservazione (pastorizzato), partendo dalle diluizioni dell'omogeneizzato preparato per la ricerca delle salmonelle (nei prodotti congelati).

3) *Ricerca delle salmonelle.* Operare come indicato per i prodotti d'uovo congelati.

III. — GELATI.

Gelati a base di latte, di crema di latte e di altri derivati del latte, con o senza uova o prodotti d'uovo o gelati comunque contenenti tali ingredienti escluse le torte variegate.

1) *Numerazione totale delle colonie* (flora aerobica a 32°C su terreno al gelisato).

2) *Numerazione dei coliformi.*

3) *Numerazione dello Staphylococcus aureus.*

4) *Ricerca delle salmonelle.*

N.B. — Per i gelati, le diluizioni vanno fatte in base al peso in g e non in base al volume.

Per le determinazioni della carica microbica, dei coliformi e degli stafilococchi l'omogeneizzazione e le diluizioni saranno eseguite con acqua triptonata all'1‰ (pH 7,0 ± 0,2) previamente distribuita e sterilizzata in flaconi da 200 ml, con perle di vetro, nel quantitativo di 90 ml per ogni flacone.

1) *Numerazione totale delle colonie* (flora aerobica a 32°C su terreno al gelisato).

Previa omogeneizzazione in acqua triptonata all'1‰ utilizzare un terreno colturale inteso ad evitare l'interferenza dei lattobacilli, normalmente presenti nei gelati a base di latte, nel conteggio dei germi mesofili aerobi, procedere come indicato per il latte in polvere per l'alimentazione della prima infanzia.

Terreno al gelisato:

Gelisato al peptone di gelatina	g	5
Agar	»	15
Acqua distillata	ml	1000
pH finale: 7.		

Sterilizzare a 121°C per 20.

2) *Numerazione dei coliformi.*

Vedere latte a breve conservazione (pastorizzato), utilizzando diluizioni che consentano le letture del MPN fino a 1100/g.

3) *Numerazione dello Staphylococcus aureus.*

Determinazione del MPN nel terreno di Giolitti e Cantoni. Per la preparazione del terreno, vedi quanto descritto per il latte in polvere per la prima infanzia.

Per le semine procedere come segue:

preparare 3 provette della base del terreno di Giolitti e Cantoni contenenti 10 ml a doppia concentrazione ed altre 6 provette contenenti 19 ml della base del terreno di Giolitti e Cantoni a concentrazione normale. Dopo rigenerazione a ±100°C e successivo raffreddamento attorno a +45°C, introdurre asetticamente in ogni provetta 0,1 ml della soluzione di tellurito di potassio;

nelle tre provette contenenti 10 ml di terreno a doppia concentrazione introdurre (in ognuna) ml 10 della prima diluizione (10 ml della dil. 10^{-1}, pari a g 1 di gelato);

in tre provette contenenti 19 ml del terreno a concentrazione normale introdurre in ognuna ml 1 della stessa diluizione (1 ml della dil. 10^{-1}, pari a g 0,1 di gelato);

nelle ultime tre provette contenenti 19 ml del terreno a concetrazione normale introdurre in ognuna 1 ml della successiva diluizione a 10^{-2}, pari a g 0,01 di gelato.

Per i tempi di incubazione per la lettura dei risultati presuntivi e la prova di conferma vedi quanto indicato a proposito del latte in polvere per la prima infanzia.

Il calcolo del MPN va eseguito soltanto sui saggi positivi confermati.

4) *Ricerca delle salmonelle.*

Seguire lo stesso procedimento usato per le uova congelate. Partendo dall'omogeneizzato in acqua peptonata tamponata ed utilizzando come inoculo sempre 25 g per ognuna delle 10 unità campionarie.

IV. — PREPARATI PER GELATI.

Preparati per gelati a base di latte, di crema di latte e di altri derivati del latte, con o senza uova o prodotti di uovo e preparati per gelati comunque contenenti tali ingredienti.

1) *Numerazione totale delle colonie* (flora aerobica a 32°C su terreno al gelisato).

2) *Numerazione dei coliformi.*

3) *Numerazione dello Staphylococcus aureus.*

4) *Ricerca delle salmonelle.*

Seguire le stesse metodiche indicate per i gelati.

TABELLA *MPN*

Numero di tubi positivi			MPN in g o ml
g o ml	g o ml	g o ml	
1 0,1	0,1 0,01	0,01 0,001	1 0,1
0	0	0	< 0,3
0	0	1	0,3
0	1	0	0,3
0	2	0	0,6
1	0	0	0,4
1	0	1	0,7
1	1	0	0,7
1	1	1	1,1
1	2	0	1,1
1	2	1	1,5
1	3	0	1,6
2	0	0	0,9
2	0	1	1,4
2	1	0	1,5
2	1	1	2,0
2	2	0	2,1
2	2	1	2,8
3	3	0	2,9
3	0	0	2
3	0	1	4
3	0	2	6
3	1	0	4
3	1	1	7
3	1	2	12
3	2	0	9
3	2	1	15
3	2	2	21
3	2	3	29
3	3	0	20
3	3	1	50
3	3	2	110
3	3	3	> 110

RICERCA DELLA FOSFATASI E DELL'ALFA-AMILASI

RICERCA DELLA FOSFATASI (Metodo di Aschaffenburg e Mullen).

La prova è intesa a valutare la idonea pastorizzazione del latte mediante il rilevamento della fosfatasi; tale enzima, infatti, risulta inattivato se il processo di pastorizzazione è stato eseguito correttamente.

La fosfatasi, eventualmente presente nel latte, idrolizza il paranitrofenilfosfato bisodico incolore, determinando la comparsa di paranitrofenolo che, in soluzione alcalina, assume colorazione gialla più o meno intensa, proporzionale all'attività dell'enzima.

Il dosaggio dell'enzima viene eseguito per via colorimetrica comparando il colore ottenuto con dischi di vetro colorato, controllati per taratura.

Attrezzatura occorrente.

Comparatore «Lovibond» 1000, completo di prisma, di sostegno per le provette, di camera di illuminazione per luce bianca, di disco a 7 colori (A P T W 7), corrispondenti al colore prodotto rispettivamente da 0, 6, 10, 14, 18, 25 e 42 microgrammi (μg) di p-nitrofenolo per ml di latte.

Il comparatore va corredato di due cellule parallelepipede di 25 mm per il controllo della soluzione del substrato, dell'attacco per dette celle e di un conveniente numero di provette per reazione e lettura, di vetro neutro incolore, standardizzate per il diametro interno di 13,5 mm, provviste di tappi di gomma sicuramente esenti da derivati fenolici:

Bagnomaria termostato a 37°C ± 0,5 provvisto di coperchio;

Matraccio tarato da 1000 ml;

Matraccio tarato da 100 ml;

Pipette controllate da 5,0 ml (al decimo) e da 1,0 ml (al centesimo).

Avvertenza

Tutta la vetreria che si impiega dovrà essere accuratamente pulita, passandola possibilmente in soluzione sulfo cromica o in altra preparazione detergente sicuramente esente da sostanze interferenti. Dopo tale trattamento occorre procedere a prolungato risciacquo, prima in acqua corrente, poi in acqua distillata. Al termine la vetreria dovrà essere fatta asciugare e quindi riposta in luogo difeso dalla polvere. I tappi di gomma nuovi (prima dell'uso) dovranno essere fatti bollire ripetutamente in acqua distillata, fatti asciugare accuratamente e conservati al riparo dalla polvere. Ad analogo trattamento vanno sottoposti ogni volta, dopo il loro impiego.

Reattivi occorrenti.

A) *Soluzione tampone:*

Carbonato di sodio anidro (Na_2CO_3, puro per analisi)	g	3,5
Bicarbonato di sodio (NaH CO_3, puro per analisi)	»	1,5
Acqua distillata q.b. a	ml	1000,0

B) *Substrato:* p-nitrofenilfosfato bisodico.

C) *Soluzione del substrato:*

p-nitrofenilfosfato bisodico	g	0,15
Soluzione tampone (A) q.b. a	ml	100,0

Il reattivo conservato in frigorifero a +4°C può durare una settimana.

La soluzione nel comparatore «Lovibond» osservata per luce trasmessa nella cella da 25 mm, usando come bianco l'acqua distillata, deve dare un valore inferiore allo standard di 10 μg. Se il colore è più concentrato, il reattivo deve essere sostituito.

Esecuzione della prova.

Per ogni determinazione occorrono tre provette (con diametro interno standard da 13,5 mm), con i relativi tappi di gomma, da collocare su di un supporto.

In ognuna di esse si distribuiscono 5 ml di soluzione del substrato (*C*).

Cambiando ogni volta pipetta, introdurre nella *prima* provetta (I) 1 ml del latte in esame, previamente fatto bollire per 1'; fungerà da controllo negativo e servirà come bianco per la lettura.

Nella seconda provetta (II) introdurre 1 ml del latte in esame per la determinazione della fosfatasi propria (alcalina).

Nella terza provetta (III) introdurre 1 ml del latte in esame, ripastorizzato a 63°C per 30', per la determinazione di eventuale fosfatasi batterica.

Le tre provette vanno accuratamente tappate con i tappi di gomma e capovolte ripetutamente per assicurare una completa miscelazione del latte con la soluzione del substrato. Le operazioni precedentemente descritte debbono essere compiute con sufficiente rapidità per evitare una eccessiva esposizione delle provette alla temperatura ambiente.

Le tre provette sono quindi trasferite in bagnomaria coperto, termoregolato a 37°C, assicurandosi che il livello esterno dell'acqua superi di almeno 1 cm quello della miscela.

L'incubazione va protratta per 2 ore. Allo scadere del tempo si procede alle letture, utilizzando come bianco la prima provetta, contenente il latte sicuramente pastorizzato (bollito).

La superficie esterna delle provette prima del collocamento negli alloggiamenti del comparatore deve essere accuratamente asciugata con pezzuola pulita. Per la lettura si procede come segue:

collocare la I provetta (bianco) nell'alloggiamento di sinistra del comparatore, sopra il quale scorrono i dischi dei colori standard;

l'alloggiamento di destra è destinato a ricevere successivamente la II e la III provetta;

la lettura sul contenuto della II provetta (latte in esame) è destinata al rilievo della *fosfatasi propria del latte.*

La lettura sul contenuto della III provetta può informare sulla eventuale presenza di *fosfatasi batterica.*

Ogni lettura si esegue ruotando progressivamente il disco dei colori standard fino ad ottenere la coincidenza dell'intensità cromatica tra i due campi contigui visibili attraverso il prisma.

Valutazione dei risultati.

Per la valutazione dei risultati sul latte in esame (contenuto della II provetta, comparato con il bianco) attenersi ai seguenti criteri:

tra 0 e 10 µg/ml pastorizzazione ben condotta ed efficace;

$>$ 10 fino a 18 µg/ml sottopastorizzazione di grado discreto;

$>$ 18 fino a 42 µg/ml sottopastorizzazione;

$>$ 42 µg/ml gravi difetti di trattamento o aggiunta di latte crudo.

Se nella lettura del contenuto della III provetta si riscontra, a varia intensità, comparsa di colorazione gialla occorre ammettere che nel latte in esame si è formata della fosfatasi batterica. Se il valore che si legge corrisponde a quello della II provetta è lecito pensare che si tratti esclusivamente di fosfatasi batterica e che il latte, ben pastorizzato in origine, è successivamente andato incontro ad una non sottovalutabile invasione batterica. Se il valore è inferiore a quello della II provetta si può ammettere che nel latte in esame sono presenti entrambe le fosfatasi, la propria e la batterica.

RICERCA DELL'ALFA-AMILASI.

Principio: la ricerca della presenza dell'alfa-amilasi è legata alla sua termolabilità; quella presente nelle uova intere viene inattivata in proporzione alla temperatura e durata della pastorizzazione.

Addizionando salda d'amido a uova intere non pastorizzate, l'amido viene idrolizzato dall'enzima in esse presente e aggiungendo successivamente una soluzione di iodio non appare la colorazione blu violetto tipica della reazione dell'amido con lo iodio.

L'intensità della colorazione è diversamente proporzionale alla quantità di alfa-amilasi (tanto minore quanto la quantità di questa è maggiore) e ciò permette di verificare l'efficienza del trattamento termico impiegato per la pastorizzazione.

Il metodo sotto descritto si applica alle uova intere (albume e tuorlo).

Trattamento del campione: deve essere esaminato al più presto possibile, altrimenti deve essere conservato ad una temperatura inferiore a +4°C, meglio se congelato.

In ogni caso l'analisi va eseguita su materiale che abbia raggiunto la temperatura ambiente immediatamente prima della prova.

Campioni mostranti segni di decomposizione o alterazione non possono essere sottoposti ad analisi.

Campioni contenenti zuccheri, acido citrico o citrati o qualsiasi ingrediente che contenga tali sostanze non possono essere saggiati in quanto queste interferiscono nella reazione.

Precauzioni: è importante tenere presente di:

a) usare acqua distillata o deionizzata per la preparazione di reagenti e per le diluizioni;

b) evitare di contaminare le uova o i reagenti con saliva;

c) pulire e asciugare accuratamente tutta la vetreria prima dell'uso;

d) usare una pipetta nuova per ogni unità campionaria;

e) evitare di contaminare le pipette con la saliva (collocare del cotone all'imboccatura analogamente a quanto si fa in microbiologia);

f) quando una unità campionaria dà risultato positivo per la presenza di alfa-amilasi, pulire con la massima cura tutta la vetreria usata nell'analisi e disinfettarla.

Reagenti:

a) Salda d'amido: essiccare dell'amido solubile p.a. in pesafiltro a 100°C per 16 ore o a +160°C per 1 ora; far raffreddare in essiccatore. Pesare 0,70 g di amido e mescolarli con poca acqua distillata fredda fino ad ottenere una crema fluida. Trasferirla quantitativamente (lavando il recipiente con poca acqua) in un matraccio tarato da 100 ml contenente circa 50 ml di acqua distillata bollente, far bollire per 60'' raffreddare rapidamente in acqua corrente, aggiungere 3 gocce di toluene e portare a segno con acqua distillata. Questa soluzione non si conserva più di 15 giorni.

b) Soluzione di iodio: può essere agevolmente preparata impiegando le soluzioni titolate madri pronte per l'uso e facilmente reperibili in commercio seguendo attentamente le istruzioni date dal produttore per la preparazione.

Al momento dell'analisi versare 1 ml della soluzione n/10 in un matraccio tarato da 100 ml e portare a segno con acqua distillata per ottenere la soluzione n/1000.

Volendo preparare la soluzione titolata di iodio in laboratorio, operare come segue:

preparare:

1) soluzione di iodio: sciogliere g 12,700 di iodio metallico p.a. in una soluzione di 25 g di ioduro di potassio in 30 ml di acqua distillata, portare a 1000 ml in pallone tarato. Si ottiene così una soluzione approssimativamente n/10 stabile per 6 mesi;

2) soluzione di ioduro di potassio: sciogliere 335 g di ioduro di potassio in acqua distillata, portare a 1000 ml in matraccio tarato. Al momento dell'uso versare in un matraccio tarato da 100 ml 1 ml della soluzione 1 (iodio n/10) e ml 1 della soluzione 2 (ioduro di potassio) e portare a 100 ml con acqua distillata. Si ottiene così una soluzione di iodio n/1.000.

Avvertenza: le soluzioni di iodio devono essere tenute in bottiglie di vetro neutro scuro e con tappo smerigliato.

Le soluzioni n/1.000 vanno preparate ogni volta prima dell'uso.

c) Acido tricloracetico: soluzione in acqua distillata al 15% (p:v), va conservata in frigorifero a +4°C in bottiglie con tappo di vetro smerigliato.

Apparecchiature:

1) Pipetta a bolla a doppia tara da 2, 5, 10 ml.

2) Matracci tarati da 100 e 1.000 ml.

3) Cilindro graduato da 50 ml.

4) Beute con collo di 2 cm di diametro.

5) Imbuti di vetro, diametro 6 cm.

6) Filtri a pieghe (carta Whatman n. 12 o equivalente) diametro cm 12,5.

7) Beute a collo largo da 100 ml con tappo a smeriglio.

8) Bagnomaria termostatato da tenere alla temperatura di 44°C ± 0,5°C.

Pulizia delle vetrerie: è importante che sia effettuata con la massima cura, una disattenzione può portare a risultati errati:

1) La vetreria nuova va sempre accuratamente pulita con miscela cromica o acido cloridrico diluito, lavata poi con acqua calda, risciacquata con acqua distillata e asciugata.

2) Subito dopo l'uso tutta la vetreria va lavata con abbondante acqua corrente per asportare ogni traccia visibile di uovo, praticare — se necessario — un ulteriore lavaggio con idrato di sodio n/10 (al 4%). Successivamente la vetreria va lavata con miscela cromica o con HCl diluito risciacquata con abbondante acqua corrente, poi con acqua distillata e asciugata.

3) tutta la vetreria usata in prove che hanno rivelato la presenza di alfa-amilasi deve essere — dopo essere stata lavata in acqua corrente (e se necessario con soda) — disinfettata con una soluzione di ipoclorito di sodio (200 ppm di cloroattivo) o di acido fenico, passata poi in miscela cromica o HCl diluito, risciacquata con abbondante acqua corrente, poi con acqua distillata e asciugata.

4) Tutta la vetreria necessaria per la ricerca dell'alfa-amilasi non deve essere usata per altri scopi e deve essere riposta in luogo separato dall'altra vetreria del laboratorio.

Avvertenza: la presenza — sulla vetreria — di residui di uova, di proteine, di detersivi, può falsare i risultati.

Procedimento analitico.

Introdurre 15,0 ml del campione di uova liquide (a temperatura ambiente) in una beuta da 100 ml con tappo a smeriglio.

Aggiungere 2,0 ml della soluzione di amido (salda d'amido). Se — come facilmente si verifica — le uova sono molto dense, è difficile vedere se la salda d'amido si è distribuita uniformemente nelle uova.

Poiché questo fatto è essenziale per avere un risultato veritiero, mescolare energicamente la miscela prima, durante e dopo l'incubazione, facendo la massima attenzione a che non si abbiano tracce di uovo che sfuggano alla esposizione alla temperatura di incubazione.

Mettere la beuta in bagnomaria a +44°C ± 0,5°C per 30 minuti.

Scaduto il tempo togliere il recipiente dal bagnomaria, agitare bene il contenuto e subito aggiungere 5 ml di questo a 5 ml di soluzione di acido tricloracetico al 15% previamente collocati in una beuta da 100 ml.

Agitare con cura per mescolare bene. Aggiungere 15 ml di acqua distillata e mescolare accuratamente.

Filtrare su filtro a pieghe (carta Whatman n. 12 o altra equivalente) scartando la prima porzione torbida del filtrato (alternativamente riversare sul filtro la prima porzione torbida).

Mettere in una beuta da 100 ml 10 ml del filtrato *limpido* e aggiungervi 2,0 ml della soluzione n/1.000 di iodio.

Risultati: l'assenza di alfa-amilasi è rivelata dalla comparsa immediata di una colorazione blu violetto.

Per determinarne l'intensità ci si può servire di un disco comparatore standard Lovibond 4/26 portante una serie di colori tipo, adatto ad essere usato in un comparatore con cuvette da 25 mm.

I colori più intensi di quello n. 3 del disco comparatore Lovibond 4/26 o di uno standard spettrofotometrico (*) sono da considerare come indicanti l'inattivazione dell'alfa-amilasi e prova che la pastorizzazione è stata effettuata.

(*) (Con cuvetta di cm 1 a una lunghezza d'onda di 585/mμ lo standard spettrofotometrico di confronto deve presentare, adoperando come bianco l'acqua, una densità ottica di 0,15).

(8711)

ANTONIO SESSA, *direttore* — DINO EGIDIO MARTINA, *redattore*

(8651188/1) Roma - Istituto Poligrafico dello Stato - S.